

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018370

International filing date: 09 December 2004 (09.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-412196  
Filing date: 10 December 2003 (10.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

13.12.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月 1 0 日  
Date of Application:

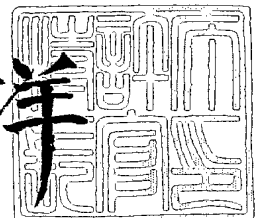
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 1 2 1 9 6  
Application Number:  
[ST. 10/C] :            [ J P 2 0 0 3 - 4 1 2 1 9 6 ]

出      願      人            理 研 ビ タ ミ ン 株 式 有 限 公 司  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    1 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 R02J1258  
【提出日】 平成15年12月10日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A23L 1/30  
A61K 35/80

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市本町 2 - 6 - 1 9  
【氏名】 船山 桂

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区幸町 1 - 9 - 6  
【氏名】 加原 卓

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都板橋区南常盤台 2 - 6 - 2  
【氏名】 田中 稔

【発明者】  
【住所又は居所】 埼玉県北葛飾郡庄和町金崎 1 2 4 6 - 5 4  
【氏名】 飯塚 真里子

【発明者】  
【住所又は居所】 兵庫県芦屋市精道町 6 - 1 0 芦屋ガーデンハイツ 2 0 2 号  
【氏名】 池田 克巳

【発明者】  
【住所又は居所】 京都府京都市左京区下鴨萩ヶ垣内町 1 0 - 1  
【氏名】 山本 潤子

【特許出願人】  
【識別番号】 390010674  
【氏名又は名称】 理研ビタミン株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100077012  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 岩谷 龍

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 066372  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0111927

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

アスコフィラム ノドサム (A s c o p h y l l u m n o d s u m) の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の抽出物の精製物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤。

## 【請求項 3】

飲食品である請求項 1 または 2 記載の糖質加水分解酵素阻害剤。

## 【請求項 4】

糖尿病の治療・予防を目的とする健康食品または特定保健用食品である請求項 3 記載の糖質加水分解酵素阻害剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】海藻抽出物およびそれを含む糖質加水分解酵素阻害剤

【技術分野】

【0001】

本発明は海藻抽出物、詳しくは褐藻類の一種であるアスコフィラム ノドサム (*Ascophyllum nodsum*) の抽出物を有効成分として含有する糖質加水分解酵素阻害剤に関する。

【背景技術】

【0002】

肥満および糖尿病等の疾患は、過剰カロリー摂取が主な原因となり、増加の一途をたどっている。糖尿病には、インスリン依存型糖尿病（1型糖尿病）とインスリン非依存型糖尿病（2型糖尿病）の2タイプがあるが、全体の90%は後者のタイプである。

インスリン非依存型糖尿病における食後高血糖の是正は、経口血糖降下剤、インスリンを用いても困難なことがあり、そのため消化管における糖質の急激な吸収を防ぐ手段として、摂取した糖質の消化に関与する酵素の活性を阻害する物質が用いられる。

【0003】

糖質加水分解酵素の阻害物質は、糖質加水分解酵素を特異的に阻害し、糖質の加水分解・吸収を遅延することにより、食後の血糖値の急上昇およびそれに続くインスリン値の上昇を抑制することが明らかにされている。

このような糖質加水分解酵素阻害剤として、 $\alpha$ -アミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害するアカルボース（商品名：グルコバイ；バイエル薬品株式会社）や、 $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害するボグリボース（商品名：ベイスン；武田薬品工業株式会社）が実際に医薬品として臨床に用いられている。しかしこれらの医薬品は医師の厳密な処方が必要であり、また言うまでもなく食品には利用できない。

【0004】

糖質加水分解酵素阻害物質およびそれを添加した食品は、前記疾患の病状を改善することから関連する代謝異常の患者に有用であり、更に日常の食生活に取り入れることにより糖尿病の予防にも適している。そのため、安全性が高く摂食可能な天然物として、海藻類（例えば、特許文献1、2、3参照。）、小麦粉（例えば、特許文献4参照。）、グアバ葉（例えば、特許文献5参照。）、クローブ（例えば、特許文献6参照。）、食用きのこ（例えば、特許文献7参照。）、タマリンド種皮（例えば、特許文献8参照。）等由来の糖質加水分解酵素阻害物質が、これまでに提案されている。

従来の天然物由来の糖質加水分解酵素阻害物質は活性が弱く、十分満足できる程のレベルに達していない。

【0005】

一方、アスコフィラム ノドサム (*Ascophyllum nodsum*) は、褐藻類ヒバマタ目、ヒバマタ科に属する海藻であり、主にノルウェーのリアス式海岸の岩礁地帯に生育している。アスコフィラム ノドサムはアルギン酸を高濃度で含有しているためアルギン酸製造用原料として利用される外、ミネラル、ビタミン類を豊富に含んでいるため、原藻を乾燥し粉末に加工された製品が飼料あるいは肥料・土壌改良剤として広く用いられているものである。

【特許文献1】特開平5-284937号公報

【特許文献2】特開2000-342224号公報

【特許文献3】特開2002-212095号公報

【特許文献4】特開昭57-140727号公報

【特許文献5】特開平7-59539号公報

【特許文献6】特開平12-072682号公報

【特許文献7】特開2000-063281号公報

【特許文献8】特開平9-291039号公報

【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明の目的は、より活性の強い天然物由来の糖質加水分解酵素阻害剤を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、褐藻類の一種であるアスコフィラム ノドサム (*Ascophyllum nodosum*) の抽出物が強力な  $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用を有することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) アスコフィラム ノドサム (*Ascophyllum nodosum*) の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤、
  - (2) 上記 (1) 記載の抽出物の精製物を有効成分として含有することを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤、
  - (3) 飲食品である上記 (1) または (2) 記載の糖質加水分解酵素阻害剤、および
  - (4) 糖尿病の治療・予防を目的とする健康食品または特定保健用食品である上記 (3) 記載の糖質加水分解酵素阻害剤、
- に関する。

## 【発明の効果】

## 【0008】

本発明で得られるアスコフィラム ノドサムからの抽出物は、強い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用を有し、さらに  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用も有するので、前記抽出物を含有する糖質加水分解酵素阻害剤は、従来知られている海藻由来の糖質加水分解酵素阻害物質に比べても、より効果的に糖尿病の治療・予防を行うことができる。

本発明の糖質加水分解酵素阻害剤は、糖尿病を治療・予防できることから、関連する代謝異常の患者に有用であり、飲食品、特に健康食品または特定保健用食品として日常の食生活に取り入れることができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0009】

本発明において、アスコフィラム ノドサム (以下アスコフィラムと略す。) は、そのいずれの組織、部位も用いることができるが、好ましくは葉茎部である。アスコフィラムからの抽出に際し、海から収穫された全藻または葉茎部をそのまま、あるいはそれらを裁断、細断または磨細したもの、またそれらを乾燥したもの、さらに全藻または葉茎部を乾燥後に裁断、細断または粉碎したものをを用いることができ、好ましくは生のものを乾燥し、粉碎されたものである。乾燥は、自体公知の方法、例えば風乾、天日乾燥、凍結乾燥などいずれの方法であってもよい。

## 【0010】

抽出溶剤としては、水または有機溶剤、またはそれらの混合液が用いられる。有機溶剤としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール、イソブタノール、*sec*-ブタノール、*tert*-ブタノール等の炭素数1~4の低級アルコール、ジメチルケトン、メチルエチルケトン、アセトンおよびメチルイソブチルケトン等のケトン類等の極性有機溶剤、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、あるいはジエチルエーテル等の非極性有機溶剤が挙げられ、さらにこれら極性有機溶剤と非極性有機溶剤を適宜組み合わせることもできる。

これらの抽出溶剤の内、好ましくは極性有機溶剤および極性有機溶剤と水の混合液、より好ましくはメタノール、エタノールまたはアセトン、またはそれらと水の混合液であり、特に好ましくは、メタノール、エタノールまたはアセトンと水の混合液である。極性有機溶剤と水の混合液の混合割合は、極性有機溶剤により異なるが、通常極性有機溶剤/水が5/95~100/0 (v/v) の範囲内である。例えば、抽出溶剤としてメタノー

ルー水混合液またはエタノール-水混合液を用いる場合、その割合としては5/95~100/0 (v/v) が挙げられ、好ましくは30/70~70/30 (v/v) である。またアセトン-水混合液を用いる場合、その割合としては5/95~100/0 (v/v) が挙げられ、好ましくは30/70~80/20 (v/v) である。これらの割合は、抽出効率、抽出物量および抽出物の酵素阻害活性等を考慮して決められるのが好ましい。

#### 【0011】

本発明において、抽出物を得るための抽出方法に制限はなく、浸漬による抽出、加熱抽出、連続抽出あるいは超臨界抽出等、自体公知の方法を用いることができる。アスコフィラムと抽出溶剤との比率は、特に制限されないが、アスコフィラム乾燥物/溶剤比が1/100~1/2 (w/v) が好ましい範囲であり、1/10~1/5 (w/v) がより好ましい範囲である。具体的には、抽出は、例えばアスコフィラムを乾燥し、粉碎した抽出原料100gに対して抽出溶剤約200mL~10L、好ましくは500mL~1Lを用い、静置または緩やかに攪拌しながら行われる。抽出温度は室温から常圧下での溶剤の沸点以下の範囲とするのが作業上便利であり、また抽出時間は抽出温度等によって異なるが、数分から7日間の範囲であり、約30分~24時間とするのが好ましい。

#### 【0012】

抽出操作終了後、ろ過あるいは遠心分離等自体公知の方法で固形物（抽残）が除かれ、抽出液が得られる。抽出液は自体公知の方法で濃縮され、黒~褐色油状またはペースト状に濃縮された抽出物が得られる。また、抽出液または濃縮された抽出物は、例えば温熱乾燥、凍結乾燥等自体公知の方法で乾燥することにより、固形の抽出物とすることもできる。

抽出液、濃縮物、または濃縮物を水および/または有機溶剤に溶解した溶液は、例えば限外ろ過、吸着樹脂処理、分子クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィーあるいは液-液抽出等の方法により精製されてもよい。精製された抽出物は、精製物として本発明に用いることができる。

#### 【0013】

本発明に係る抽出物は強い $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用を有し、さらに $\alpha$ -D-グルコシダーゼ阻害作用を有することから糖質加水分解酵素阻害剤として有用である。

なお、上記糖質加水分解酵素としては、加水分解によって糖のみを生じる単純糖質を加水分解する酵素と、糖以外の物質をも生ずる複合糖質を加水分解する酵素に分けられるが、本発明における糖質加水分解酵素とは、糖のみから成るO-グリコシル化合物を加水分解する酵素をいう。このような糖質加水分解酵素として、例えば $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -D-グルコシダーゼ、 $\beta$ -D-グルコシダーゼ、スクラーゼ、マルターゼ、イソマルターゼ、ラクターゼ、トレハラーゼ等が挙げられる。

#### 【0014】

本発明の糖質加水分解酵素阻害剤は、上記抽出物または精製物をそのまま、あるいは抽出物または精製物に製薬学的に許容される添加物、あるいは食品素材、食品原料、さらに必要に応じて食品添加物等を適宜混合し、自体公知の方法で液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、マイクロカプセル、ソフトカプセルあるいはハードカプセル等の製剤として製造されることができる。また、飲食品として、固形食品、クリーム状またはジャム状の半流動食品、ゲル状食品、飲料等あらゆる食品形態にすることが可能である。このような飲食品としては、例えば、清涼飲料、コーヒー、紅茶、乳飲料、乳酸菌飲料、ドロップ、キャンディー、チューインガム、チョコレート、グミ、ヨーグルト、アイスクリーム、プリン、水羊羹、ゼリー菓子、クッキー等が挙げられる。これら各種製剤および飲食品は、糖尿病の治療・予防を目的とする健康食品または特定保健用食品として有用である。

#### 【0015】

上記製剤および飲食品の製造に用いられる添加物、食品素材、食品原料あるいは食品添加物としては、例えば賦形剤（乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロース等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、蔗糖脂肪酸エステル等）、崩壊剤（デンプン、カルメロースナトリウム、炭酸カルシウム等）、結合剤（デンプン糊液、ヒ

ドロキシプロピルセルロース液、アラビアゴム液等)、乳化剤・溶解補助剤(アラビアゴム、ポリソルベート80、ポピドン等)、甘味料(白糖、果糖、単シロップ、ハチミツ等)、着色料(食用タール色素、酸化鉄等)、保存料(パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル、ソルビン酸等)、増粘剤(ヒドロキシエチルセルロース、ポリエチレングリコール、アルギン酸ナトリウム等)、酸化防止剤(亜硫酸水素ナトリウム、エデト酸ナトリウム、アスコルビン酸等)、安定化剤(チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等)、酸味料(レモン果汁等)、調味料(グルタミン酸ナトリウム等)、香料(ハッカ、ストロベリー香料等)等を使用することができる。

#### 【0016】

上記各種製剤および飲食品に対する該糖質加水分解酵素阻害剤の添加量としては、抽出物に含まれる活性成分の含有量により異なり一様ではないが、抽出物(固形分換算)として、例えば約0.0001~50質量%、好ましくは約0.001~20質量%、より好ましくは約0.01~10質量%である。

#### 【0017】

これら各種製剤および飲食品を経口的に摂取する場合、本発明抽出物の一日あたりの用量は、固形物に換算して、体重1kgに対して、約0.01~1000mg、好ましくは約0.1~500mg、さらに好ましくは約1~300mgの範囲である。この用量を、1回または数回に分けて摂取すると良い。但し、実際の用量は、目的や摂取者の状況(性別、年齢、体重、BMI等)を考慮して決められるべきである。

#### 【0018】

以下に本発明において好ましい実施例について述べるが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0019】

アスコフィラム乾燥粉末約50.0gを精密に量り、表1の割合のエタノール-水混合液500mLを加え、緩やかに攪拌しながら室温で1時間抽出した。抽出液を遠心管に移し、遠心分離により上澄み液と沈殿に分け、沈殿にはエタノール-水混合液500mLを加え、1回目と同様にして1時間抽出した。抽出液を1回目と同様にして上澄み液と沈殿に分け、1回目と2回目の上澄み液を合わせて吸引ろ過し、ろ液として計約1Lの抽出液を得た。この抽出液を、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、約60℃で濃縮し、次に濃縮物を凍結乾燥して黒褐色粉末状の抽出物1~6を得た。各収量を表1に示す。

【表1】

抽出物	エタノール-水混合液 (エタノール:水 (v/v))	収量 (質量%)
抽出物1	10:90	24.2
抽出物2	20:80	24.3
抽出物3	30:70	24.3
抽出物4	50:50	22.0
抽出物5	70:30	17.0
抽出物6	100:0	2.2

#### 【実施例2】

#### 【0020】

実施例1で得た抽出物の $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼ及びシュクラーゼ阻害活性を測定した。

#### 1) $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性の測定

実施例1で得た抽出物を段階希釈して5、10、15、20、25ppmに調製した試料溶液各々1mLと、4質量%デンプン溶液(0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0))に溶



解した。) 1 mL をよく混合し、37℃で5分間加温した。次に $\alpha$ -アミラーゼ(シグマ社製)溶液0.02 mL (4.25 units/0.02 mL)を加えてよく混合し、37℃で60分間反応後、沸騰湯浴で10分間保ち反応を停止して反応液を得た。対照区1は、予め沸騰湯浴で10分間保ち失活させた $\alpha$ -アミラーゼ溶液を加えて行い、対照区2は、試料溶液の代わりに水を加えて行った。

試料区と対照区1は反応液を40倍に希釈し、対照区2は反応液を4倍に希釈し、得られた各希釈液0.8 mLに、0.01 Nヨウ素溶液(0.02 Nヨウ素溶液(和光純薬工業製)を蒸留水で2倍希釈した。)0.8 mLと蒸留水4 mLを加えてよく攪拌して試験溶液とした。次に、蒸留水を対照とし、液層の長さ1 cmで波長660 nmにおける試験溶液の吸光度を測定した。

別に、1 mL中にデンプン50~800  $\mu$ gを含む標準液0.8 mLずつを用いて、上記同様に発色させた液による吸光度値から、検量線を作成した。試験溶液の吸光度と検量線から、反応液の残存デンプン量を求め、次式により阻害率を算出した。

$$\text{分解率}(\%) = (B' - S') / B' \times 100$$

S' : 試料区反応液の残存デンプン量 ( $\mu$ g/mL)

B' : 対照区1反応液の残存デンプン量 ( $\mu$ g/mL)

$$\text{阻害率}(\%) = (C - S) / C \times 100$$

S : 試料区の分解率 (%)

C : 対照区2の分解率 (%)

#### 【0021】

##### 2) マルターゼ阻害活性の測定

〔粗酵素溶液の調製〕

ラット腸管アセトン粉末(シグマ社製)に18倍量(質量)の0.1 Mマレイン酸緩衝液(pH 6.0)を加えて氷冷しながらホモジナイズし、遠心分離(約0℃、3000 rpm、10分間)により得た上澄み液を0.1 Mマレイン酸緩衝液(pH 6.0)で10倍(容量)希釈し、粗酵素溶液とした。

〔阻害活性の測定〕

実施例1で得た抽出物を段階希釈して0.05、0.1、0.2、0.4質量%に調製した試料溶液各々0.2 mLと、2質量%マルトース溶液(0.1 Mマレイン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解する。)0.2 mLをよく混合し、37℃で5分間加温した。次に粗酵素溶液0.2 mLを加えてよく混合し、37℃で60分間反応後、沸騰湯浴で10分間保ち反応を停止した。反応液を室温まで放冷後遠心分離(約20℃、3,000 rpm、10分間)し、上澄み液を得た。対照区1は、予め沸騰湯浴で10分間保ち失活させた粗酵素溶液を加えて行い、対照区2は、試料溶液の代わりに水を加えて行った。

試料区、対照区1および対照区2の上澄み液のグルコース量は、グルコースオキシダーゼ法による測定キット(グルコースCII-テストワコー;和光純薬工業製)を用いて測定し、次式により阻害率を算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = (C - (S - B)) / C \times 100$$

S : 試料区上澄み液のグルコース量 (mg/100 mL)

C : 対照区2上澄み液のグルコース量 (mg/100 mL)

B : 対照区1上澄み液のグルコース量 (mg/100 mL)

#### 【0022】

##### 3) シュクラーゼ阻害活性の測定

〔粗酵素溶液の調製〕

ラット腸管アセトン粉末(シグマ社製)に18倍量の0.1 Mマレイン酸緩衝液(pH 6.0)を加えて氷冷しながらホモジナイズし、遠心分離(約0℃、3000 rpm、10分間)により得た上澄み液を粗酵素溶液とした。

〔阻害活性の測定〕

実施例1で得た抽出物を段階希釈して0.05、0.1、0.2、0.4質量%に調製した試料溶液各々0.2 mLと、2質量%シュクロース溶液(0.1 Mマレイン酸緩衝液

(pH 6.0) に溶解する。) 0.2 mL をよく混合し、37℃で5分間加温した。次に粗酵素溶液 0.2 mL を加えてよく混合し、37℃で60分間反応後、沸騰湯浴で10分間保ち反応を停止した。反応液を室温まで放冷後遠心分離 (約20℃、3,000 rpm、10分間) し、上澄み液を得た。対照区1は、予め沸騰湯浴で10分間保ち失活させた粗酵素溶液を加えて行い、対照区2は、試料溶液の代わりに水を加えて行った。

試料区、対照区1および対照区2の上澄み液のグルコース量は、グルコースオキシダーゼ法による測定キット (グルコース CII-テストワコー; 和光純薬工業製) を用いて測定し、次式により阻害率を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = (C - (S - B)) / C \times 100$$

S: 試料区上澄み液のグルコース量 (mg / 100 mL)

C: 対照区2上澄み液のグルコース量 (mg / 100 mL)

B: 対照区1上澄み液のグルコース量 (mg / 100 mL)

#### 【0023】

阻害活性は、各酵素活性を50%阻害するときの濃度 (IC<sub>50</sub>) で示した。抽出物のα-アミラーゼ阻害活性、マルターゼ阻害活性およびシュクラーゼ阻害活性の結果を、表2に示す。

【表2】

抽出物	阻害活性 (IC <sub>50</sub> )		
	α-アミラーゼ	マルターゼ	シュクラーゼ
抽出物3	128.5	987.5	1723.7
抽出物4	170.4	1119.7	1896.5
抽出物5	173.8	1284.0	1765.3
抽出物6	42.8	723.4	923.2

(単位: μg/mL)

表2から、前記実施例1で得た抽出物3～6はα-アミラーゼ阻害活性およびα-D-グルコシダーゼ阻害活性を有し、特にα-アミラーゼ阻害活性の強いことが分かる。

#### 【実施例3】

##### 【0024】

各種海藻の乾燥粉末約50.0gを精密に量り、エタノール-水 [30:70 (v/v)] 混合液500mLを加え、緩やかに攪拌しながら室温で1時間抽出した。抽出液を遠心管に移し、遠心分離により上澄み液と沈殿に分け、沈殿にはエタノール-水 [30:70 (v/v)] 混合液500mLを加え、1回目と同様にして1時間抽出した。抽出液を1回目と同様にして上澄み液と沈殿に分け、1回目と2回目の上澄み液を合わせて吸引ろ過し、ろ液として計約1Lの抽出液を得た。この抽出液を、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、約60℃で濃縮し、次に濃縮物を凍結乾燥して粉末状の抽出物 (抽出物7、比較例1～8) を得た。

これら抽出物のα-アミラーゼ阻害活性を、前記実施例2に準じて測定した。試料溶液の濃度は10 μg/mL、100 μg/mL、1000 μg/mLの3点とした。結果は表3に阻害率 (%) で示す。

【表 3】

	海藻の種類	阻害率 (%)		
		10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
抽出物 7	アスコフィラム (褐藻)	25.4	94.4	95.3
比較例 1	アナアオサ (緑藻)	0	0	0
比較例 2	モヅク (褐藻)	0	0	0
比較例 3	コンブ (褐藻)	0	8.2	95.8
比較例 4	アラメ (褐藻)	0	0	0
比較例 5	ワカメ (褐藻)	0	0	8.9
比較例 6	ホンダワラ (褐藻)	0	0	4.6
比較例 7	ヒジキ (褐藻)	0	0	0
比較例 8	ヒラクサ (紅藻)	0	0	0

表 3 から、アスコフィラムの抽出物は他の海藻類に比べて強い  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有し、しかも低濃度でもその活性が発現することが分かる。

## 【実施例 4】

## 【0025】

## ラット糖負荷試験

前記実施例 1 で得た抽出物 1、抽出物 3 および抽出物 4 を試料として、ラットを用いた糖負荷試験を行った。一晩絶食した 9 週齢の Wistar 系ラットを対照群、試料投与群それぞれ 5 匹ずつ用いた。ラットの尾静脈からヘパリン入り採血管に約 0.5 mL 採血した。採血後、対照群にはデンプン 1 g/体重 kg を、試料投与群にはデンプンとして 1 g/体重 kg、試料として 1 g/体重 kg になるよう混合・調製したものを、それぞれ胃ゾンデを用いて経口投与した。投与後、30、60 及び 120 分後に約 0.5 mL 採血した。採血した血は遠心分離で血漿画分を分画して、分析に供するまで  $-40^{\circ}\text{C}$  で保存した。

血漿グルコース量は、グルコースオキシダーゼ法による測定キット (グルコース CII-テストワコー; 和光純薬工業製) を用いて測定した。血漿グルコース量の経時変化を表 4 に示す。

【表 4】

経時時間 (分)	血漿グルコース量 ( $\text{mg}/100\text{mL}$ ) (数値は平均値 $\pm$ 標準偏差)			
	対照群	投与群 (1)	投与群 (2)	投与群 (3)
0	117 $\pm$ 17	120 $\pm$ 9	119 $\pm$ 17	118 $\pm$ 9
30	166 $\pm$ 11	138 $\pm$ 14 *	138 $\pm$ 14 *	144 $\pm$ 7 *
60	154 $\pm$ 8	130 $\pm$ 10 *	136 $\pm$ 26	145 $\pm$ 13
120	121 $\pm$ 15	121 $\pm$ 2	127 $\pm$ 12	121 $\pm$ 6

\* 対照群に対して危険率 1% で有意差あり。

投与群 (1): 実施例 1 の抽出物 1 を試料として投与

投与群 (2): 実施例 1 の抽出物 3 を試料として投与

投与群 (3): 実施例 1 の抽出物 4 を試料として投与

本発明の抽出物は、デンプン投与後 30 分で対照群と比較して、有意に血漿中のグルコース量の上昇を抑制することが分かる。

## 【実施例 5】

## 【0026】

アスコフィラム乾燥粉末約 800 g に、エタノール-水 [50:50 (v/v)] 混合液 8 L を加え、緩やかに攪拌しながら室温で 1 時間抽出した。抽出液を遠心管に移し、遠心分離により上澄み液と沈殿に分け、沈殿にはエタノール-水混合液 8 L を加え、1 回目と同様にして 1 時間抽出した。抽出液を 1 回目と同様にして上澄み液と沈殿に分け、1 回目と 2 回目の上澄み液を合わせて吸引ろ過し、ろ液として計約 16 L の抽出液を得た。この抽出液を、分画分子量 1 万の限外ろ過膜（製品名：FB02-VC-FUSO181；ダイセンメンブレンシステムズ社）を用いて限外ろ過し、濃縮液量が 5 L になった時点で水 5 L を加えてろ過を続け、濃縮液量が再び 5 L になった時点で限外ろ過を終了した。濃縮液を、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、約 60℃ で濃縮し、次に濃縮物を凍結乾燥して黒褐色粉末状の抽出物（抽出物 8）約 73 g を得た。

## 【実験例 6】

## 【0027】

乳糖 50 質量部、コーンスターチ 38 質量部、レモン香料 1 質量部及び蔗糖脂肪酸エステル 1 質量部に、上記実施例 5 の抽出物 8 を 10 質量部加えて混合後、打錠機を用いて打錠し、サプリメントを作製した。

## 【実験例 7】

## 【0028】

表 5 に示す配合の飲料溶液を約 65℃ で 10 分間加熱処理し、室温まで冷却した後滅菌容器に無菌的に充填し、りんご果汁飲料を作製した。

【表 5】

成分	配合量（質量％）
果糖ブドウ糖液糖	14
りんご透明果汁	10
香料	0.2
酸味料	0.15
ビタミン C	0.03
色素	0.01
実施例 5 の抽出物 8	1.00
水	74.61
合計	100

## 【実験例 8】

## 【0029】

以下の手順でコーヒーゼリーを作製した。

- (1) 粉ゼラチン 15 g を約 45 mL の水に入れ、ふやかしておく。
- (2) 鍋に水 600 mL、インスタントコーヒー 3 g、グラニュー糖 80 g を入れ煮立たせる。グラニュー糖が溶けたら火を止め、実施例 5 の抽出物 8 約 7 g と (1) を加えてよく溶かす。
- (3) 荒熱を取ってブレンダー約 10 mL を加え、冷ましてトロミが付けば内側を湿らせたゼリー型に流し込み、冷やして固める。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0030】

本発明で得られるアスコフィラム ノドサムからの抽出物は、強い糖質加水分解酵素阻害作用を有するので、アスコフィラム ノドサムからの抽出物を含有する糖質加水分解酵素阻害剤は、従来知られている海藻由来の糖質加水分解酵素阻害物質に比べても、より効

果的な糖尿病の治療・予防効果を得ることができる。また上記抽出物を含有する飲食品は  
糖尿秒の治療・予防用の健康食品または特定保健用食品として有用である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 従来知られているものに比べて、より活性の強い天然物由来の糖質加水分解酵素阻害剤を提供すること。

【解決手段】 褐藻類の一種であるアスコフィラム ノドサム (*Ascophyllum nodosum*) の抽出物を有効成分とすることを特徴とする糖質加水分解酵素阻害剤。上記糖質加水分解酵素阻害剤は、糖尿病の治療・予防を目的とする有用な健康食品あるいは特定保健用食品として提供できる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 1 2 1 9 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 9 0 0 1 0 6 7 4 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 1 0 月 2 5 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区三崎町 2 丁目 9 番 1 8 号

氏 名 理研ビタミン株式会社